

На правах рукописи

ФАТЫХОВА АЛИНА РИНАТОВНА

**БИОСИНТЕЗ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ ДРОЖЖАМИ *YARROWIA LIPOLYTICA*
ИЗ ГЛИЦЕРИН-СОДЕРЖАЩИХ ОТХОДОВ ПРОИЗВОДСТВА
БИОДИЗЕЛЬНОГО ТОПЛИВА**

03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Пушино – 2011

Работа выполнена в лаборатории аэробного метаболизма микроорганизмов Учреждения Российской академии наук Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пущино

Научный руководитель: доктор биологических наук
Моргунов Игорь Григорьевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Козловский Анатолий Григорьевич

доктор биологических наук
Рукавцова Елена Борисовна

Ведущая организация: ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов»

Защита диссертации состоится «__» _____ 2011 г. в __ час. __ мин. на заседании Диссертационного совета Д 002.121.01 при Учреждении Российской академии наук Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН по адресу: 142290, Московская обл., г. Пущино, проспект Науки, д. 5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН. Автореферат размещен на сайте: <http://www.ibpm.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2011 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
доктор биологических наук



В.М. Вагабов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

В последние десятилетия в связи с удорожанием нефтепродуктов и ухудшением экологической обстановки резко возрос интерес к использованию альтернативных источников топлива, получаемых из растительного сырья, таких как биодизельное топливо. В Евросоюзе к 2030 г. планируется доведение доли биотоплива в общем объеме моторного топлива до 25% (Himmel et al., 2007).

Сырьем для производства биодизельного топлива могут быть различные растительные масла и животные жиры. В ходе процесса триглицериды масел гидролизуются до глицерина и жирных кислот, затем жирные кислоты метилируются, в результате чего образуются их метиловые эфиры, которые и используются в качестве биодизельного топлива. Побочными продуктами производства являются технический глицерин в виде 70-80%-ного водного раствора, остатки масла и свободных жирных кислот. Проблема утилизации глицерин-содержащих отходов становится ключевой в процессе производства биодизельного топлива: на каждую тонну произведенного биодизельного топлива накапливается 100 кг технического глицерина (Дебабов, 2008). В настоящее время ведутся интенсивные поиски возможностей переработки технического глицерина в продукты с высокой стоимостью. Разрабатываются процессы микробиологического получения 1,3-пропандиола, белка и липидов, аминокислот и органических кислот.

Наибольший интерес представляет лимонная кислота (ЛК). Ежегодно в мире производится 1 млн. 400 тыс. тонн ЛК с годовым приростом производства 3-5% от существующего уровня (Socol et al., 2006). Наряду с традиционным использованием ЛК в пищевой, химической и фармацевтической промышленности рассматриваются новые направления ее применения, расширяется использование ее натриевой соли в составе синтетических моющих средств в качестве заменителя полифосфатов, опасных для экологии.

Традиционная технология производства ЛК из мелассы при помощи мицелиальных грибов *Aspergillus niger* имеет ограниченную сырьевую базу, является многостадийным и экологически небезопасным процессом. В последние годы в ИБФМ РАН разработаны процессы получения ЛК с использованием дрожжей *Yarrowia lipolytica* из этилового спирта, глюкозы и растительных масел. Возможность использования глицерин-содержащих отходов производства биодизельного топлива в качестве источника углерода для роста дрожжей и биосинтеза ЛК на момент начала работы не была изучена.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы являлось изучение закономерностей биосинтеза ЛК из глицерин-содержащих отходов производства биодизельного топлива у дрожжей *Y. lipolytica*, способов управления их биосинтетической активностью и разработка на этой основе эффективных методов получения ЛК.

В число основных задач входило:

1. Изучение способности дрожжей различной таксономической принадлежности к ассимиляции глицерин-содержащих отходов и синтезу ЛК; отбор продуцентов ЛК;
2. Определение условий культивирования штаммов-продуцентов, оптимальных для получения ЛК;
3. Исследование основных физиологических и биохимических закономерностей образования лимонных кислот, а также путей и механизмов их биосинтеза;
4. Изучение особенностей роста дрожжей и синтеза ЛК в периодическом режиме и в условиях отъемно-доливного и непрерывного культивирования (с использованием мембранного модуля).
5. Выбор способа культивирования, обеспечивающего наиболее продолжительный, интенсивный и стабильный синтез ЛК из глицерин-содержащих отходов.

Научная новизна работы

Впервые установлена принципиальная возможность направленного синтеза ЛК дрожжами в среде с глицерин-содержащими отходами производства биодизельного топлива. Среди изученных организмов штаммы *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373 (704), *Y. lipolytica* N 15 и *Y. lipolytica* A-101-1.22 отобраны в качестве наиболее активных продуцентов. Подобраны условия культивирования (рН среды, концентрация растворенного кислорода, концентрация глицерина), обеспечивающие интенсивный синтез ЛК.

Показано, что продукция ЛК у ацетат-негативного мутанта *Y. lipolytica* N 15 происходит вследствие высокой активности цитратсинтазы и резко сниженной активности аконитат-гидратазы.

Практическая значимость работы

Впервые показана возможность использования дешевого возобновляемого субстрата - отходов производства биодизельного топлива для получения ЛК с помощью дрожжей, что делает этот процесс перспективным для реализации в промышленных масштабах. Предложенный процесс в условиях отъемно-доливного культивирования обеспечивает стабильное поддержание концентрации ЛК на уровне более 120 г/л в течение 47 суток. Методы получения ЛК из глицерин-содержащих отходов апробированы в полупромышленных масштабах, получены опытные партии ЛК,

соответствующей ГОСТ 908-79 и СанПиН 2.3.2.1078-0 (Протокол о проведении процесса биосинтеза и приготовления опытной партии лимонной кислоты на базе Опытной технологической установки ИБФМ РАН от 20.04.2011; Протокол о проведении испытаний лимонной кислоты на содержание токсичных элементов ООО «ИЛ Тест-Пушино» № 2695 от 25.04.2011).

Апробация работы

Основные материалы диссертации были представлены на Международных Пушинских школах-конференциях для молодых учёных (2007, 2008, 2010), ежегодных стендовых сессиях ИБФМ РАН (2007-2010), Международной школе-конференции «Генетика микроорганизмов и биотехнология» (Москва, 2008) и Всероссийской конференции с элементами научной школы для молодежи «Кадровое обеспечение развития инновационной деятельности в России» (Москва, 2010).

Публикации

По теме диссертационной работы опубликовано 11 печатных работ, в том числе 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объём диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей описание материалов и методов исследований, изложение полученных результатов и их обсуждение, заключения, выводов, списка цитируемой литературы и приложений. Работа изложена на __ страницах, содержит __ таблицы и __ рисунков. Список литературы включает __ наименований, из них __ – публикации в иностранных изданиях.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Микроорганизмы. Объектами исследования являлись 59 природных штаммов дрожжевых организмов, относящихся к родам *Candida*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Torulopsis* и *Yarrowia* из Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБФМ РАН, а также 7 ацетат-негативных мутантов *Y. lipolytica* из коллекции культур лаборатории аэробного метаболизма микроорганизмов ИБФМ РАН и факультета биотехнологии и пищевой микробиологии Университета естественных наук г. Вроцлав (Польша).

Методы культивирования. В качестве основной среды для выращивания дрожжей использовали минеральную среду Ридер, которую

готовили на дистиллированной воде с добавлением смеси микроэлементов по Буркгольдеру. В качестве источника углерода использовали глицерин или глицерин-содержащие отходы, полученные с завода Rafineria Trzebinia SA (Польша). Условием сверхсинтеза ЛК являлось лимитирование роста культуры азотом. Культивирование проводилось в колбах или ферментерах АНКУМ-2М объемом 3 л (с исходным объемом среды 1,5 л) или 10 л (с исходным объемом среды 5 л) и в ферментере Biostat В Plus (Германия) объемом 5 л (с исходным объемом среды 1,8 и 2 л). Ферментации проводились при pH=5-5,5, поддерживаемом добавлением NaOH, концентрации растворенного кислорода 55-60% от насыщения и скорости оборотов мешалки 800 об/мин. Глицерин или глицерин-содержащие отходы добавлялись периодически, как указано в тексте диссертации.

Аналитические методы. Рост культур контролировали путем измерения сухой массы дрожжей. Содержание аммонийного азота анализировали с помощью ионометра фирмы «Orion» (США).

Содержание глицерина определяли энзиматическим методом, используя набор стандартных реагентов («Boehringer Mannheim», Германия): в основе метода лежит окисление глицерина в сопряженной реакции с глицеролкиназой, l-лактат-дегидрогеназой и пируваткиназой с образованием эквимольного количества НАДН, которое детектируется при 340 нм.

Концентрацию ЛК и изолимонной кислоты (ИЛК) определяли с помощью ВЭЖХ на колонке Inertsil ODS-3 (250x4мм) («Элсико», Россия) с обращенной фазой. В качестве подвижной фазы использовали 20 mM H₃PO₄. Скорость элюции составляла 1 мл/мин, температура 35°C, детекция проводилась при 210 нм. В качестве стандартов использовали набор органических кислот фирмы «Sigma» (США). Дополнительно ЛК определяли химическим методом, а ИЛК - энзиматическим методом.

Содержание полиолов определяли с помощью изократической ВЭЖХ на колонке Aminex HPLX-87H, 300x78мм («Bio-Rad», США), соединенной с рефрактометром.

Метилловые эфиры жирных кислот анализировали методом газожидкостной хроматографии (Султанович с соавт., 1982). Содержание липидов в биомассе определяли по сумме жирных кислот, используя в качестве внутреннего стандарта гептадекановую кислоту.

Анализ содержания углерода, водорода и азота на «С, Н, N» анализаторе фирмы «Carlo Erba Strumentazione» (Италия), золы (методом сжигания в муфельной печи) проводили в лаборатории масс-спектрометрии ИБФМ РАН.

Активность ферментов определяли на спектрофотометре UV-160 «Shimadzu» (Япония) в бесклеточных гомогенатах клеток, отобранных в разные фазы роста. Дезинтеграцию дрожжей проводили на планетарной мельнице с помощью стеклянных бус «баллотини» или на прессе Френча. Методы измерения активности ферментов подробно изложены в диссертации.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Способность дрожжей продуцировать лимонную кислоту из глицерина, отбор продуцента

Изучена способность 59 природных штаммов дрожжей, принадлежащих к родам *Debaryomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* и *Yarrowia*, а также 7 мутантов дрожжей вида *Y. lipolytica* синтезировать ЛК из глицерина.

Для проверки культур был использован экспресс-метод оценки активности кислотообразования на агаризованной среде с мелом. По зонам растворения мела, которые образуются за счет выделения органических кислот, оценивалось кислотообразование. Отбор продуцента проводили в среде с глицерином. Как видно из таблицы 1, все исследуемые штаммы росли в среде с глицерином. Лимитирование роста приводило к экскреции кислот у 41 штамма (40 штаммов вида *Y. lipolytica* и 1 штамм вида *C. paludigena*), но у 25 штаммов экскреции не наблюдалось (штаммы, относящиеся к родам *Debaryomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*). Среди дрожжей вида *Y. lipolytica* 8 штаммов не образовывали кислот. 15 штаммов имели зону растворения мела, равную 0,5-2 мм, 9 штаммов - 2,5-4 мм, 3 штамма - 4,5-6 мм, 6 штаммов - 6,5-8,0 и 7 штаммов имели зону растворения мела выше 8 мм.

Для дальнейшей работы были отобраны природный штамм *Y. lipolytica* 704 и ацетат-негативные мутанты НГ 40, НГ 80, N 11, N 13, N 15 и А-101-1.22, у которых зона растворения мела была максимальной.

Следует отметить, что тест на агаризованной среде на кислотообразование не дает возможности однозначно сказать какая кислота - ЛК или ИЛК накапливается в среде. С целью идентификации кислот, а также для проверки результатов, полученных методом селекции на твердой среде, проводили культивирование отобранных штаммов в жидкой среде Ридер с глицерином в условиях дефицита азота.

Определение биомассы, содержания ЛК и ИЛК в культуральной жидкости проводили на 6 суток. Также были рассчитаны соотношение ЛК:ИЛК, выход ЛК от потребленного глицерина ($Y_{\text{ЛК}}$, г/г) и продуктивность биомассы (Р, выраженная как количество ЛК в г, продуцируемое 1 г клеток; г ЛК/г клеток) для каждого варианта эксперимента. Как видно из таблицы 2, штаммы синтезировали одновременно ЛК и ИЛК, соотношение ЛК:ИЛК варьировало от 4:1 до 11:1. Наибольшее накопление ЛК было отмечено у природного штамма *Y. lipolytica* 704, тогда как мутанты *Y. lipolytica* N 15 и *Y. lipolytica* А-101-1.22 характеризовались наиболее низким содержанием ИЛК, соотношение ЛК:ИЛК составляло 11:1 и 10:1 соответственно. Максимальное значение выхода ЛК от потребленного глицерина (более 50%) было отмечено для *Y. lipolytica* 704 и мутантов *Y. lipolytica* N 15 и *Y. lipolytica* А-101-1.22. Продуктивность биомассы варьировала от 4,1 до 5,9 г ЛК/г клеток и у *Y. lipolytica* 704 была максимальной.

Таблица 1. Кислотообразующая способность дрожжей, растущих на глицерин-содержащей агаризованной среде с мелом в условиях лимитирования роста азотом

Вид дрожжей	D (мм)	Вид дрожжей	D (мм)	Вид дрожжей	D (мм)
<i>Candida brumptii</i> ВКМ Y-5	0	<i>Y. lipolytica</i> 69	3	<i>Y. lipolytica</i> 655	0
<i>C. rugosa</i> ВКМ Y-67	0	<i>Y. lipolytica</i> 76	1	<i>Y. lipolytica</i> 666	0
<i>C. olea</i> ВКМ Y-57	0	<i>Y. lipolytica</i> 79	2	<i>Y. lipolytica</i> 667	8
<i>C. paludigena</i> ВКМ Y-2443	2,0	<i>Y. lipolytica</i> 86	8	<i>Y. lipolytica</i> 668	1,5
<i>C. pelliculosa</i> ВКМ Y-118	0	<i>Y. lipolytica</i> 212	8	<i>Y. lipolytica</i> 670	0,5
<i>C. catenulata</i> ВКМ Y-36	0	<i>Y. lipolytica</i> 214	4	<i>Y. lipolytica</i> 672	0
<i>C. zeylanoides</i> ВКМ Y-6	0	<i>Y. lipolytica</i> 281	4	<i>Y. lipolytica</i> 681	4,5
<i>C. zeylanoides</i> ВКМ Y-14	0	<i>Y. lipolytica</i> 374/1	3	<i>Y. lipolytica</i> 683	7
<i>C. zeylanoides</i> ВКМ Y-2324	0	<i>Y. lipolytica</i> 374/3	1,5	<i>Y. lipolytica</i> 694	5
<i>C. zeylanoides</i> ВКМ Y-2595	0	<i>Y. lipolytica</i> 374/4	0,5	<i>Y. lipolytica</i> 695	3
<i>C. guilliermondii</i> H-P-4	0	<i>Y. lipolytica</i> 374/5	2	<i>Y. lipolytica</i> 704	8,5
<i>Debaryomyces sp.</i>	0	<i>Y. lipolytica</i> 374/6	0	<i>Y. lipolytica</i> 706	7
<i>Pichia besseyi</i> ВКМ Y-2084	0	<i>Y. lipolytica</i> 374/8	1	<i>Y. lipolytica</i> 709	4
<i>P. media</i> ВКМ Y-1381	0	<i>Y. lipolytica</i> 387	2	<i>Y. lipolytica</i> 710	5
<i>P. inositovora</i> ВКМ Y-2494	0	<i>Y. lipolytica</i> 571	2	<i>Y. lipolytica</i> 716	2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ВКМ Y-381	0	<i>Y. lipolytica</i> 581	1	<i>Y. lipolytica</i> УФ 5	8
<i>Torulopsis candida</i> 127	0	<i>Y. lipolytica</i> 582	2	<i>Y. lipolytica</i> НГ 40	9
<i>T. candida</i> 420	0	<i>Y. lipolytica</i> 585	1	<i>Y. lipolytica</i> НГ 80	9
<i>Yarrowia lipolytica</i> 12a	0	<i>Y. lipolytica</i> 591	0	<i>Y. lipolytica</i> N 11	9
<i>Y. lipolytica</i> 9b	3	<i>Y. lipolytica</i> 607	3,5	<i>Y. lipolytica</i> N 13	10
<i>Y. lipolytica</i> ВКМ Y-47	0	<i>Y. lipolytica</i> 645	4	<i>Y. lipolytica</i> N 15	11
<i>Y. lipolytica</i> 68	0	<i>Y. lipolytica</i> 646	1	<i>Y. lipolytica</i> A-101-1.22	11

D - зона растворения мела

Таблица 2. Рост и кислотообразование *Y. lipolytica* в жидкой среде с глицерином

Организм	Биомасса (г/л)	ЛК (г/л)	ИЛК (г/л)	ЛК:ИЛК	Y _{ЛК} (%)	P (г ЛК/г клеток)
<i>Y. lipolytica</i> 704	3,55	21,16	4,43	4,8:1	53,0	5,96
<i>Y. lipolytica</i> НГ 40	3,94	16,60	3,49	4,8:1	42,0	4,21
<i>Y. lipolytica</i> НГ 80	3,78	15,44	3,84	4,0:1	39,0	4,1
<i>Y. lipolytica</i> N 11	3,10	16,64	2,65	6,3:1	42,0	5,36
<i>Y. lipolytica</i> N 13	3,45	16,04	3,32	4,8:1	40,0	4,64
<i>Y. lipolytica</i> N 15	3,39	19,08	1,70	11,2:1	55,0	5,33
<i>Y. lipolytica</i> A-101-1.22	4,10	20,80	2,00	10,4:1	55,0	5,07

Для дальнейшей работы были отобраны природный штамм *Y. lipolytica* 704, характеризующийся максимальным накоплением ЛК и мутанты *Y. lipolytica* N 15 и *Y. lipolytica* A-101-1.22, которые отличаются преимущественным синтезом ЛК.

2. Основные условия и динамика образования лимонной кислоты

При культивировании дрожжей *Y. lipolytica* на полноценных питательных средах образования ЛК не происходит. Условием сверхсинтеза ЛК является лимитирование роста дрожжей минеральными компонентами среды – азотом, фосфором или серой при одновременном избыточном содержании в среде глицерин-содержащих отходов (результаты подробно изложены в диссертации). Нами исследовано влияние условий культивирования (изменение рН среды, аэрации и концентрации глицерина) на синтез ЛК у дрожжей *Y. lipolytica*.

Подбор условий проводили для природного штамма *Y. lipolytica* 704 и мутанта *Y. lipolytica* N 15 в среде с глицерином. На рис. 1 представлены данные о влиянии рН среды, аэрации и концентрации глицерина на биосинтез *Y. lipolytica* N 15. Аналогичные результаты получены для *Y. lipolytica* 704, которые подробно изложены в диссертации.

При всех исследованных значениях рН среды (в диапазоне от 3,0 до 8,0) клетки *Y. lipolytica* синтезировали ЛК, интенсивное кислотообразование наблюдалось в интервале рН=4,5–6,0, при более низком значении рН (3,0) и более высоких значениях рН (7,0-8,0) накопление ЛК снижалось (рис. 1а).

Биосинтез ЛК в значительной степени зависит от уровня насыщения среды кислородом (рис. 1б). Максимальный синтез ЛК дрожжами *Y. lipolytica* в среде с глицерином происходил при аэрации 0,30 и 0,56 ммоль O₂/л/мин, при уменьшении содержания кислорода ниже 0,2 ммоль O₂/л/мин биосинтез ЛК снижался в 1,5 раза.

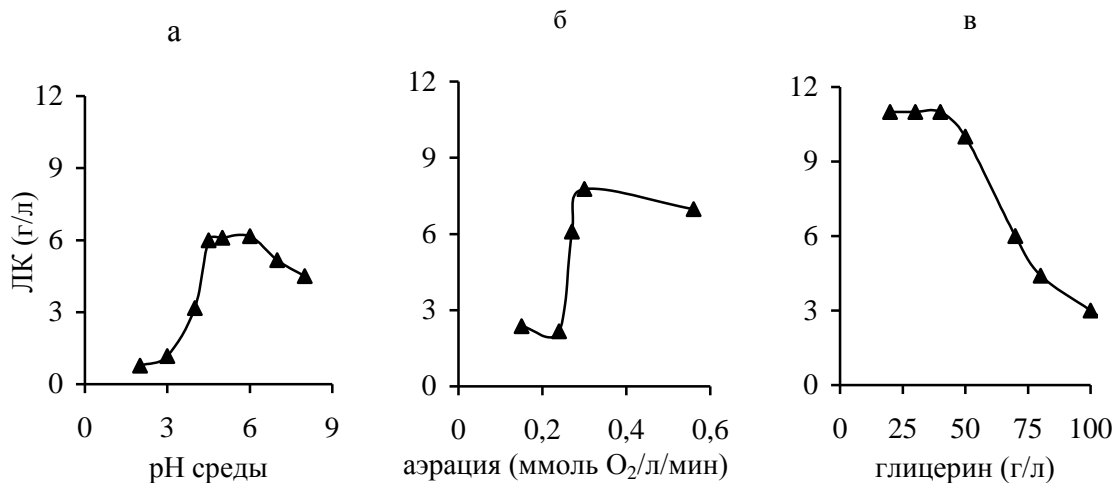


Рис. 1. Влияние pH среды, аэрации и содержания глицерина на синтез ЛК у дрожжей *Y. lipolytica*

На биосинтез ЛК также существенное влияние оказывала концентрация глицерина в среде (рис. 1в). При всех исследованных концентрациях глицерина происходило кислотообразование. Максимальное накопление ЛК (11,0 г/л) наблюдалось при содержании глицерина в среде от 20 до 40 г/л, повышение концентрации глицерина свыше 70 г/л снижало биосинтез ЛК в 2 раза.

В результате проведенных исследований подобраны условия культивирования, обеспечивающие наибольший синтез ЛК дрожжами *Y. lipolytica* в среде с глицерином: pH=4,5-6,0, интенсивная аэрация среды (на уровне 0,30 и 0,56 ммоль O₂/л/мин) и концентрация глицерина 20-40 г/л. Оптимизация условий культивирования привела к увеличению биосинтеза ЛК в 1,8 раза у *Y. lipolytica* N 15.

3. Биосинтез лимонной кислоты дрожжами *Y. lipolytica* при росте на глицерин-содержащих отходах

Эксперименты по изучению кислотообразующей активности природного штамма *Y. lipolytica* 704 и мутантов *Y. lipolytica* N 15 и *Y. lipolytica* A-101-1.22 в среде с отходами производства биодизельного топлива проводили в ферментере в периодическом режиме. Культивирование природного штамма *Y. lipolytica* 704 и его мутанта *Y. lipolytica* N 15 проводили в ферментере АНКУМ-2М объемом 3 л (исходный объем среды 1,5 л) и объемом 10 л (исходный объем среды 5,0 л), мутантного штамма *Y. lipolytica* A-101-1.22 в ферментере Biostat В Plus объемом 5 л (исходный объем среды 2 л) на минеральной среде Ридер в условиях лимитирования азотом. Данные о динамике роста, потребления азота, глицерин-содержащих отходов и накопления ЛК и ИЛК у исследуемых штаммов представлены на рис. 2.

Y. lipolytica 704

Y. lipolytica N 15

Y. lipolytica A-101-1.22

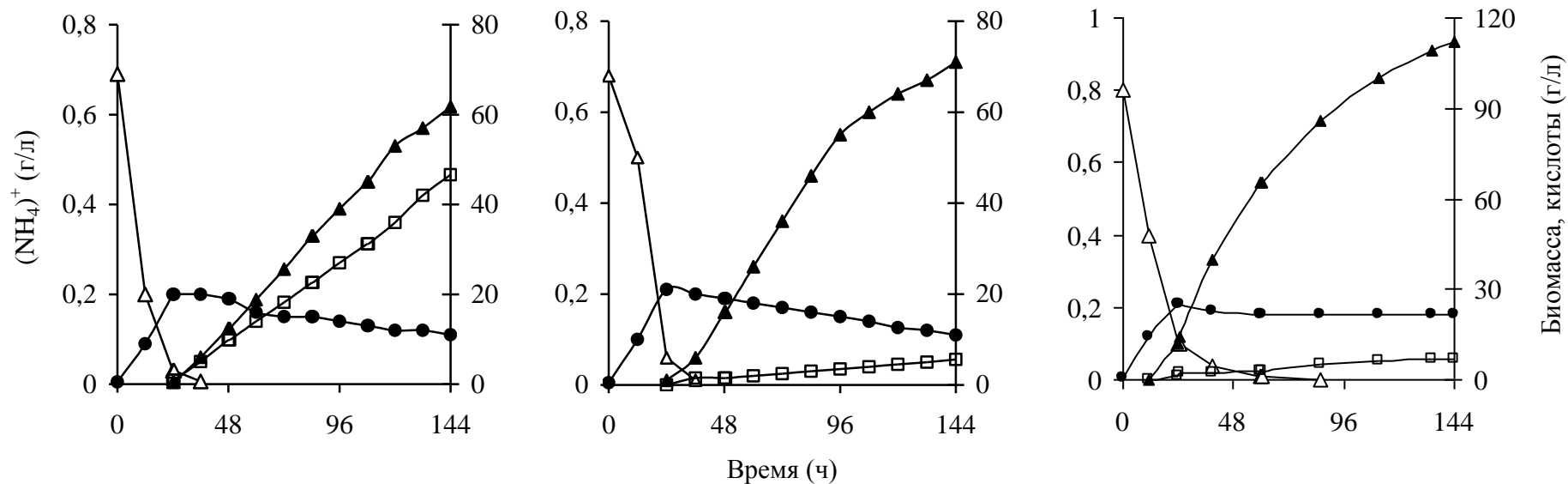


Рис. 2. Динамика роста (●), потребления сульфата аммония (Δ) и продукции ЛК (▲) и ИЛК (□) у штаммов-продуцентов *Y. lipolytica* в среде с глицерин-содержащими отходами

Процесс образования ЛК является трехфазным процессом: в первой фазе происходит активный рост культуры и потребление лимитирующего компонента среды, в это время кислоты практически не образуются. Интенсивный синтез кислот начинается после снижения содержания азота ниже порогового уровня (200 мг/л) и перехода культуры в фазу замедленного роста и далее – в стационарную фазу роста. Синтез кислот продолжается до тех пор, пока в среде присутствует источник углерода.

Различия между штаммами сводились к различиям в количестве накапливаемых ЛК и ИЛК при малоизменяющейся биомассе. У *Y. lipolytica* 704 обе кислоты образовывались приблизительно в равном количестве (61,7 г/л ЛК и 46,6 г/л ИЛК), в то время как мутанты синтезировали преимущественно ЛК. На 144 ч роста у *Y. lipolytica* N 15 накопление ЛК составляло 71,0 г/л, и содержание ИЛК было незначительно (5,6 г/л).

Максимальный биосинтез ЛК (112 г/л) с незначительным накоплением ИЛК (7,1 г/л) наблюдался у *Y. lipolytica* А-101-1.22, соотношение ЛК:ИЛК при этом составляло 15,8:1.

Элементный состав биомассы продуцента *Y. lipolytica* А-101-1.22, содержание белка и липидов представлены в таблице 3. В период экспоненциального роста дрожжи накапливали значительное количество белка (26,9% а.с.б.), доля липидов была незначительна (7,4% а.с.б.). Лимитирование роста клеток азотом, наряду с экскрецией ЛК, приводило к четко выраженному изменению направленности биосинтетических процессов: снижению содержания белка (с 26,9% до 15,7%) и увеличению содержания липидов.

Таблица 3. Состав биомассы продуцента *Y. lipolytica* А-101-1.22

Параметры	Фаза роста (12 ч)	Фаза синтеза ЛК	
		(39 ч)	(87 ч)
<i>Содержание компонентов (% а.с.б.)</i>			
Белок	26,9	15,7	16,1
Липиды	7,4	11,8	17,8
Углерод	46,6	46,6	48,6
Водород	6,7	7,0	6,7
Азот	4,7	2,9	2,5
Кислород	37,0	36,8	39,9
Энергосодержание биомассы (кДж/г)	18,9	19,6	19,7
<i>Жирно-кислотный состав (% от суммы жирных кислот)</i>			
C _{16:0}	20,8	19,2	17,4
C _{16:1}	12,3	17,5	19,9
C _{18:0}	2,3	3,7	4,1
C _{18:1}	28,1	42,6	45,6
C _{18:2}	36,5	16,4	12,3

Сравнительно высокий уровень липидов (17,8%) в клетках *Y. lipolytica* в поздней стационарной фазе (87 ч), по-видимому, был связан с тем, что значительная часть ацетил-КоА, образующегося при потреблении отходов, поступает не в ЦТК, а в систему биосинтеза жирных кислот. Внутриклеточное содержание углерода (46,6 – 48,6%), водорода (6,7 – 7,0%) и кислорода (36,8 – 39,9%) изменялось незначительно в ходе культивирования, в то время как содержание внутриклеточного азота снижалось с 4,7% в фазе роста до 2,9% в фазе синтеза. Энергосодержание биомассы увеличивалось с 18,9 до 19,7 кДж/г и коррелировало с накоплением липидов в клетке.

При культивировании на глицерин-содержащих отходах в биомассе продуцента образовывались преимущественно олеиновая ($\Delta^9\text{C}_{18:1}$), пальмитиновая ($\text{C}_{16:0}$), пальмитолеиновая ($\Delta^9\text{C}_{16:1}$) и линолевая ($\Delta^{9,12}\text{C}_{18:2}$) кислоты. При переходе в стационарную фазу роста наблюдались значительные изменения в жирно-кислотном составе биомассы: содержание линолевой кислоты снижалось с 36,5 до 12,3%, а содержание олеиновой кислоты увеличивалось с 28,1 до 45,6%.

Таким образом, разнообразный химический состав биомассы продуцента, наличие в клетках белка, липидов, витаминов (рибофлавин), ЛК и макроэлементов представляет возможность использования этой биомассы в качестве обогатителя комбикормов.

4. Механизм биосинтеза лимонной кислоты

Для изучения путей биосинтеза ЛК были определены активности ферментов начальных этапов метаболизма глицерина и ЦТК у природного штамма *Y. lipolytica* 704 и мутанта *Y. lipolytica* N 15. Клетки отбирались в фазу экспоненциального роста (кислоты не образовывались) и в стационарную фазу роста (в период активного синтеза лимонных кислот). В таблице 4 представлены данные, полученные при определении активности ферментов.

У обоих штаммов при ассимиляции отходов производства биодизеля активность глицеролкиназы – первого фермента вовлечения глицерина в метаболизм - была на довольно высоком уровне в период экспоненциального роста и снижалась незначительно в период синтеза ЛК. Можно отметить, что активность глицеролкиназы при росте на глицерин-содержащих отходах сопоставима с таковой при росте дрожжей *Y. lipolytica* на чистом глицерине (Моргунов, 1994).

Для обоих штаммов характерна высокая активность ключевого фермента цитратсинтазы, ответственного за синтез цитрата, которая также снижалась незначительно в период синтеза ЛК. Активность этого фермента у мутантного штамма была в 1,5 раза выше, чем у природного штамма.

Таблица 4. Активности ферментов у *Y. lipolytica* в период синтеза лимонных кислот (мкмоль/мин на мг белка)

Ферменты	<i>Y. lipolytica</i> 704		<i>Y. lipolytica</i> N 15	
	Рост	Синтез	Рост	Синтез
Глицеролкиназа	0,105	0,085	0,112	0,091
Цитратсинтаза	1,16	1,11	1,74	1,60
Малатдегидрогеназа	2,0	2,8	3,7	3,8
Аконитат-гидратаза	0,33	0,16	0,12	0,01
Изоцитратдегидрогеназа (НАД ⁺)	0,105	0,12	0,09	0,01
Изоцитратдегидрогеназа (НАДФ ⁺)	0,12	0,125	0,08	0,09
Изоцитрат-лиаза	0,08	0,072	0,089	0,100

Высокой как в ростовой, так и в стационарной фазе, оставалась активность малатдегидрогеназы, фермента, вовлеченного в процесс ресинтеза оксалоацетата. Активность малатдегидрогеназы у мутантного штамма также была значительно выше, чем у *Y. lipolytica* 704.

Активности цитратсинтазы и малатдегидрогеназы у обоих штаммов значительно превышали активности последующих ферментов цикла: аконитат-гидратазы и изоцитратдегидрогеназ.

Соотношение синтезируемых дрожжами ЛК и ИЛК определяется соотношением активностей ферментов цитратсинтазы, аконитат-гидратазы и НАД-изоцитратдегидрогеназы. Высокая активность цитратсинтазы и резко сниженная активность аконитат-гидратазы (в период синтеза снижающаяся еще в 10 раз) приводит к преимущественному синтезу ЛК у мутанта *Y. lipolytica* N 15, в то время как достаточно высокая активность аконитат-гидратазы при одновременно низкой активности НАД-изоцитратдегидрогеназы приводит к экскреции как ЛК, так и ИЛК у природного штамма *Y. lipolytica* 704.

При ассимиляции глицерина ресинтез оксалоацетата может осуществляться за счет карбоксилирования пирувата и фосфоенолпирувата и необходимость в функционировании глиоксилатного цикла, как поставщика оксалоацетата в ЦТК, отсутствует (активность изоцитрат-лиазы в клетках, выращенных на глицерине очень низкая – 0,009 мкмоль/мин на мг белка) (Моргунов, 1994). В литературе имеются сведения о низкой активности изоцитрат-лиазы при росте *Y. lipolytica* в среде с глюкозой (Ermakova et al., 1986). При росте дрожжей *Y. lipolytica* на глицерин-содержащих отходах активность изоцитрат-лиазы значительно выше (0,07- 0,1 мкмоль/мин на мг белка). Это может быть обусловлено наличием в отходах жирных кислот, являющихся индукторами ферментов глиоксилатного цикла. Таким образом, глиоксилатный цикл также может быть вовлечен в процесс ресинтеза оксалоацетата при биосинтезе ЛК дрожжами из глицерин-содержащих отходов производства биодизеля.

5. Разработка способа культивирования, обеспечивающего наиболее продолжительный, интенсивный и стабильный синтез лимонной кислоты
Недостатком периодического культивирования является его ограниченная продолжительность.

Таблица 5. Динамика продуктивности культуры при периодическом культивировании *Y. lipolytica* A-101-1.22

Время (ч)	24 – 39	39 – 61	61 – 86	86 – 111	111 – 134	134 – 144
q_p (г/г·ч)	0,076	0,060	0,039	0,034	0,0091	0,006

Продуктивность культуры (q_p) *Y. lipolytica* A-101-1.22 (таблица 5), максимальная в начале биосинтеза ЛК, постепенно снижалась в ходе культивирования, что делало нецелесообразным продолжение процесса дольше 6 суток. Возможными причинами снижения синтеза ЛК являлось резкое снижение метаболической активности клеток, а также ингибирующее действие высоких концентраций ЛК. Указанные недостатки периодического культивирования определяли необходимость поиска других способов культивирования, позволяющих продлить активный синтез ЛК.

5.1. Использование мембранного модуля для биосинтеза лимонной кислоты

Одним из перспективных способов увеличения продолжительности микробиологических процессов при получении метаболитов, экскретируемых в культуральную жидкость, является культивирование с использованием мембранного биореактора.

Мембранный биореактор представляет собой ферментер, оснащенный фильтрующим модулем. Данный способ культивирования предоставляет возможность непрерывно удалять образующийся продукт, что особенно важно при его ингибирующем воздействии на продуцент. Вся биомасса продуцента остается в ферментере и продолжает синтезировать продукт. При данном способе культивирования в ферментер подается среда, содержащая субстрат и лимитирующий рост компонент в количестве, обеспечивающим поддержание клеток в активном состоянии, но недостаточном для клеточного роста. В условиях постоянного выведения ЛК из культуральной жидкости можно было ожидать увеличения продолжительности ферментации за счет поддержания концентрации ЛК, не ингибирующей метаболизм клеток.

На рис. 3 представлены результаты эксперимента с использованием выносного спирального мембранного модуля. Скорость потока и общая продолжительность ферментации составляли $0,014 \text{ ч}^{-1}$ и 500 ч соответственно.

Интенсивное кислотообразование (96-107 г/л) наблюдалось до 300 ч культивирования. Средняя объемная продуктивность процесса и удельная скорость синтеза ЛК в данный промежуток времени (100-300 ч) поддерживались высокими и составляли $1,42 \text{ г/л·ч}$ и $0,64 \text{ г/г·ч}$ соответственно.

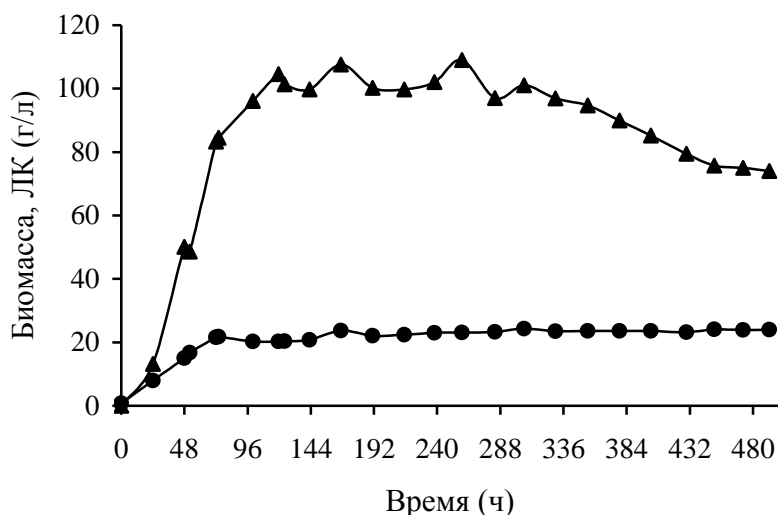


Рис. 3. Биосинтез ЛК дрожжами *Y. lipolytica* A-101-1.22 при использовании мембранного биореактора с фильтрующим модулем: ● биомасса, ▲ ЛК.

После 300 ч культивирования наблюдалось снижение синтеза ЛК. Снижение скорости образования ЛК не было связано с повышением ее концентрации в культуральной жидкости, поскольку в данном эксперименте концентрация ЛК в ферментере поддерживалась на уровне 100 г/л (в условиях периодического культивирования при данной концентрации у *Y. lipolytica* A-101-1.22 наблюдалось активное образование ЛК).

Таким образом, эксперименты с использованием мембранного модуля показали, что данный метод культивирования дает возможность значительно продлить синтез ЛК без снижения скорости кислотообразования.

5.2. Отъемно-доливной метод культивирования

Отъемно-доливной способ культивирования представляет собой процесс, при котором производится отъем культуральной жидкости через определенные промежутки времени, и в ферментер добавляется свежая питательная среда. В сравнении с традиционным периодическим процессом применение отъемно-доливного метода культивирования часто делает процесс более эффективным.

При проведении экспериментов варьировали количество доливаемой среды и длительность циклов, в каждом из которых культивирование осуществляли в периодическом режиме. Были исследованы следующие варианты: отъем-долив 40% или 30% культуральной жидкости с клетками через 3 суток и отъем-долив 20% культуральной жидкости с клетками через 5 суток. Процесс культивирования продуцента *Y. lipolytica* A-101-1.22 в режиме отъемов-доливов продолжали в течение 1129 ч (т.е. 47 суток).

На рис. 4 представлены результаты отъемно-доливного метода культивирования. Как видно из рисунка, даже на 886 ч концентрация ЛК была высокой и составляла 119,9 г/л.

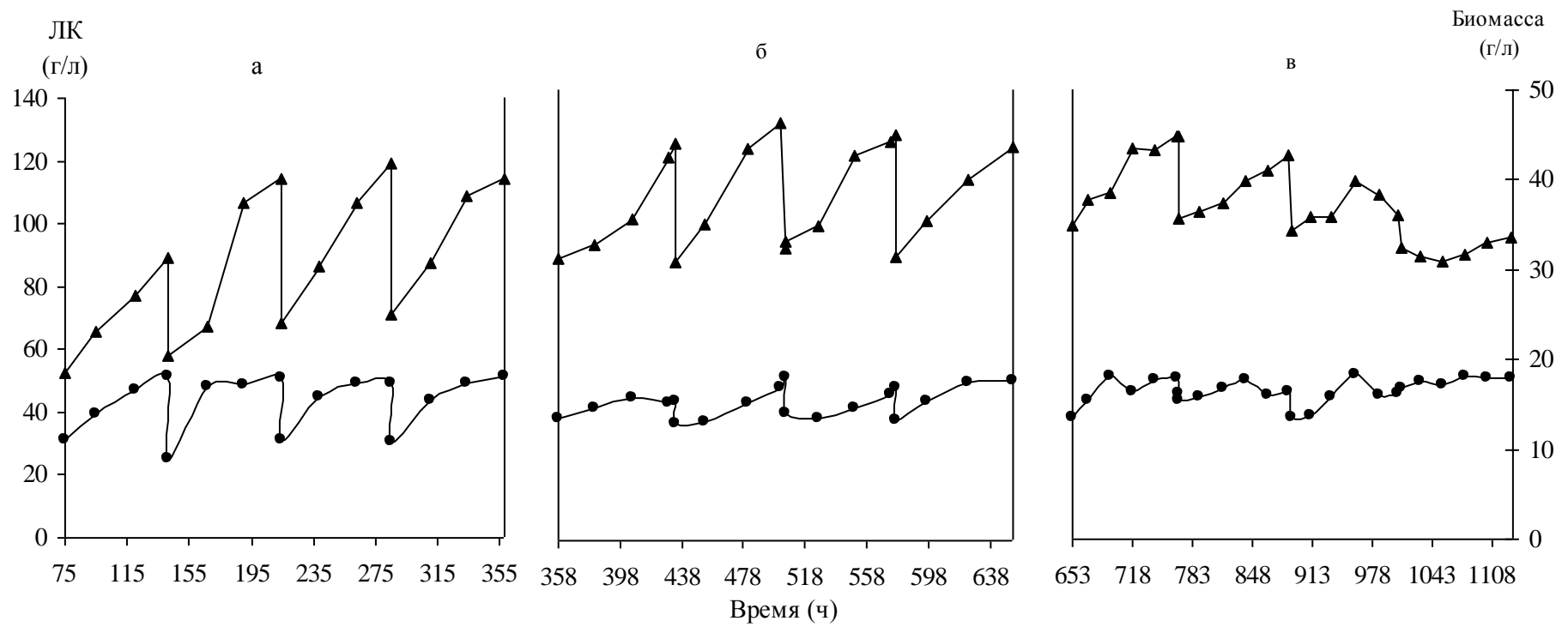


Рис. 4 . Биосинтез ЛК дрожжами *Y. lipolytica* А-101-1.22 в режиме отъемов-доливов: отъем-долив 40%, продолжительность цикла 3 сут (а); 30%, 3 сут (б); 20%, 5 сут (в). ● биомасса, ▲ ЛК

Таблица 6. Биосинтез ЛК *Y. lipolytica* А-101-1.22 при культивировании методом отъемов-доливо

Режим	Биомасса (г/л)	ЛК (г/л)	ИЛК (г/л)	Эритритол (г/л)	Маннитол (г/л)	С _{ЛК} (г/л·ч)	q _p (г/г·ч)	Y _{ЛК} (%)
40% 3 сут	18,1	108,4	7,15	0,50	2,68	0,808	0,047	64,0
30% 3 сут	17,0	124,2	7,20	13,45	3,63	0,850	0,050	77,0
20% 5 сут	16,4	112,6	7,60	45,20	4,75	0,510	0,023	55,0

В таблице 6 представлены содержание биомассы, концентрация ЛК, а также побочных продуктов – ИЛК, эритритола и маннитола, продуктивность культуры, объемная продуктивность процесса (С_{ЛК}), выход продукта от потребленного субстрата при разных режимах культивирования.

При использовании режима отъем-долив (30% каждые 3 сут) в культуральной жидкости накапливалось 124,2 г/л ЛК, и продуктивность ферментера составляла 0,85 г/л·ч; эти показатели на 11% и 20% соответственно были выше, чем при периодическом режиме.

При увеличении количества доливаемой среды с 30% до 40% наблюдалось снижение биосинтеза ЛК (108,4 г/л), что, возможно, было вызвано высокой степенью обновления культуры; при этом производительность ферментера (0,808 г/л·ч) и выход ЛК от потребленного субстрата (0,64 г/г) были выше, чем при периодическом режиме.

Уменьшение количества доливаемой среды с 30% до 20% и увеличение продолжительности цикла с 3 до 5 сут приводило к значительному снижению биосинтеза ЛК и увеличению образования полиолов: эритритола (до 45,2 г/л) и маннитола (4,75 г/л).

Экскреция полиолов имела место при росте *Y. lipolytica* на глицерин-содержащих отходах при всех режимах отъемно-доливного культивирования. Это заставляет предполагать, что выделение полиолов имеет какое-то определенное метаболическое значение. В литературе экскрецию полиолов рассматривают как защитную реакцию клетки на стрессовую ситуацию – избыток ЛК или глицерина (Rymowicz et al., 2009). Вполне вероятно, что образование полиолов штаммом *Y. lipolytica* А-101-1.22 в настоящей работе происходило в ответ на высокие концентрации ЛК в среде.

Во всех вариантах культивирования в режиме отъемов-доливо содержание ИЛК не превышало 7% от суммы лимонных кислот, как и при периодическом режиме.

При культивировании методом отъемов-доливо макроэлементный состав биомассы продуцента, содержание белка и липидов поддерживались

стабильными в течение длительного времени культивирования и соответствовали параметрам фазы активного синтеза ЛК (39 ч) при периодическом режиме.

Аналогичные исследования проведены с мутантным штаммом *Y. lipolytica* N 15, результаты подробно изложены в диссертации.

В итоге настоящей работы показана возможность практического получения ЛК дрожжами *Y. lipolytica* из глицерин-содержащих отходов; подобраны условия культивирования, обеспечивающие максимальную продукцию ЛК; созданы научные основы процесса получения ЛК в периодическом, отъемно-доливном и непрерывном режиме с использованием мембранного модуля.

В таблице 7 представлена сравнительная характеристика различных способов культивирования с использованием трех изучаемых штаммов. При использовании метода отъемов-доливо́в достигаются более высокие результаты у мутантных штаммов *Y. lipolytica* A-101-1.22 и *Y. lipolytica* N 15 по сравнению с периодическим культивированием при полном сохранении активности культуры в течение длительного времени. Кроме того, отъемно-доливной способ позволяет снизить расходы сырья, тепло- и электроэнергии за счет сокращения количества необходимого посевного материала и увеличения времени между циклами подготовки и стерилизации ферментера.

Таблица 7. Эффективность процессов биосинтеза ЛК из глицерин-содержащих отходов

Режим	Штамм	Время (ч)	ЛК (г/л)	ИЛК (г/л)	Y _{ЛК} (%)	C _{ЛК} (г/л·ч)
Периодический	<i>Y. lipolytica</i> 704	144	61,7	46,6	59,0	0,620
	<i>Y. lipolytica</i> N 15	144	71,0	5,6	90,0	0,890
	<i>Y. lipolytica</i> A-101-1.22	144	112,0	7,1	60,0	0,708
Мембранный модуль ^а	<i>Y. lipolytica</i> A-101-1.22	500	96-107	6,4	64,0	1,42
Отъемно-доливной ^б	<i>Y. lipolytica</i> N 15	862	145,2	1,9	96,0	0,85
	<i>Y. lipolytica</i> A-101-1.22	1129	124,2	7,2	77,0	0,85

^а Мембранный модуль в интервале 100-300 ч,

^б Режим отъемов-доливо́в 30% 3 сут для *Y. lipolytica* A-101-1.22 и 30% 4 сут для *Y. lipolytica* N 15

На основании результатов настоящего исследования могут быть разработаны рекомендации для процесса утилизации глицерин-содержащих отходов производства биодизельного топлива и получения из них ЛК и ее соли цитрата натрия.

ВЫВОДЫ

1. Впервые обнаружена способность дрожжевых организмов ассимилировать глицерин-содержащие отходы в качестве источника углерода и энергии и продуцировать в значительных количествах ЛК. В качестве продуцентов отобраны природный штамм *Y. lipolytica* 704 и мутанты *Y. lipolytica* N 15 и *Y. lipolytica* A-101-1.22.

2. Созданы научные основы технологии получения ЛК дрожжами *Y. lipolytica* из глицерин-содержащих отходов производства биодизельного топлива. Подобраны условия культивирования для штаммов *Y. lipolytica* 704 и *Y. lipolytica* N 15, обеспечивающие максимальную продуктивность биосинтеза ЛК в условиях периодического культивирования. Они включали: ограничение роста дрожжей источником азота; стабильное поддержание рН на уровне 4,5-6,0; интенсивную аэрацию среды (на уровне 0,30-0,56 ммоль O₂/л/мин) и содержание глицерина в среде от 20 до 40 г/л.

3. Показано, что при росте на глицерин-содержащих отходах природный штамм *Y. lipolytica* 704 продуцирует примерно равные количества ЛК и ИЛК. При росте на глицерине доля ИЛК гораздо меньше. Преимущественного синтеза ЛК удалось добиться с применением мутантов *Y. lipolytica* N 15 и *Y. lipolytica* A-101-1.22.

4. Биосинтез лимонных кислот биохимически охарактеризован. Высокая активность цитратсинтазы и резко сниженная активность аконитат-гидратазы приводит к преимущественному синтезу ЛК у мутанта *Y. lipolytica* N 15, в то время как достаточно высокая активность аконитат-гидратазы при низкой активности НАД-изоцитратдегидрогеназы приводит к экскреции как ЛК, так и ИЛК у природного штамма.

5. В условиях периодического культивирования *Y. lipolytica* достигнуты высокие концентрации ЛК в среде (110 г/л), но вместе с тем показано, что этот способ культивирования имеет ограниченную продолжительность. Впервые показана принципиальная возможность продолжительного синтеза ЛК из глицерин-содержащих отходов с использованием мембранного модуля.

6. Показано, что отъемно-доливной метод культивирования является наиболее эффективным. Процесс обеспечивает высокую биосинтетическую активность дрожжей (концентрация ЛК на уровне 120 г/л) в течение более 47 суток.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

Статьи в рецензируемых журналах

1. Фатыхова А.Р., Камзолова С.В., Моргунов И.Г. Биосинтез лимонной кислоты дрожжами на среде с глицерином // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. 2007. Т. 3. № 4. С. 5-13.
2. Камзолова С.В., Фатыхова А.Р., Моргунов И.Г. Биосинтез лимонной кислоты дрожжевыми организмами из глицерин-содержащих продуктов // Биотехнология. 2008. № 5. С. 50-58.
3. Rymowicz W., Fatykhova A.R., Kamzolova S.V., Rywińska A., and Morgunov I.G. Citric acid production from glycerol-containing waste of biodiesel industry by *Yarrowia lipolytica* in batch, repeated batch, and cell recycle regimes // Applied Microbiology and Biotechnology. 2010. V. 87. № 3. P. 971-979.
4. Kamzolova S.V., Anastassiadis S.G., Fatykhova A.R., Golovchenko N.P., and Morgunov I.G. Strain and process development for citric acid production from glycerol-containing waste of biodiesel manufacture // In: Current Research, Technology and Educational Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. Ed. A. Méndez-Vilas. Publisher: Formatex Research Center. 2010. V. 2 ISBN (13): 978-84-614-6195-0. P. 1020-1028.
5. Kamzolova S.V., Fatykhova A.R., Dedyukhina E.G., Anastassiadis S.G., and Morgunov I.G. Citric acid production by yeast grown on glycerol-containing waste from biodiesel industry // Food Technology and Biotechnology. 2011. V. 49. № 1. P. 65-74.

Статьи в научных сборниках и других изданиях

1. Фатыхова А.Р., Камзолова С.В., Моргунов И.Г. Использование глицерина в качестве субстрата для роста и синтеза лимонных кислот дрожжей *Yarrowia lipolytica* // Материалы 11-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых учёных «Биология – наука XXI века», Пущино, 2007. С. 218.
2. Фатыхова А.Р., Камзолова С.В., Моргунов И.Г. Использование отходов производства биодизеля для микробиологического получения лимонной кислоты // Материалы VI Международной научной конференции «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии», Минск, 2008. С. 258-261.
3. Фатыхова А.Р., Моргунов И.Г. Синтез лимонной кислоты дрожжами *Yarrowia lipolytica* при росте на отходах биодизеля // Материалы Международной школы-конференции «Генетика микроорганизмов и биотехнология», Москва – Пущино, 2008. С. 179-180.

4. Фатыхова А.Р., Моргунов И.Г. Биосинтез лимонной кислоты из глицерин-содержащих отходов при отъемно-доливном способе культивирования // Материалы 14-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых учёных «Биология – наука XXI века», Пущино, 2010. С. 293-294.

5. Фатыхова А.Р., Римович В., Рывинска А., Камзолова С.В., Моргунов И.Г. Биосинтез лимонной кислоты дрожжами *Yarrowia lipolytica* в условиях непрерывного культивирования // Материалы VII Международной конференции «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии», Минск, 2010. С. 173-174.

6. Фатыхова А.Р., Моргунов И.Г. Биоконверсия глицерин-содержащих отходов производства биодизеля в лимонную кислоту // Материалы Всероссийской конференции с элементами научной школы для молодежи «Кадровое обеспечение развития инновационной деятельности в России», Москва, 2010. С. 148-150.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность и признательность своему научному руководителю д.б.н. И.Г. Моргунову за постоянное внимание и ценные советы. Автор благодарна к.б.н. С.В. Камзоловой, проф. В. Римовичу и д-ру А. Рывинске (Университет естественных наук г. Вроцлав, Польша), д.б.н. Т.В. Финогеновой, к.б.н. Э.Г. Дедюхиной, которые оказывали неоценимую помощь на разных этапах работы, а также всем сотрудникам лаборатории аэробного метаболизма микроорганизмов ИБФМ РАН за помощь и поддержку при выполнении настоящей работы.